



---

## **Actes des journées coton du Cirad**

**Montpellier, du 17 au 21 juillet 2000**

---

**Programme Coton  
Cirad-ca**



# Quels moyens pour la transgénèse sur cotonnier ?

Bernard HAU, Catherine PANNETIER, Marc GIBAND, Hâna CHAIR  
Projet Ressources génétiques, Programme coton, Cirad-ca, Montpellier  
Maurice VAISSAYRE  
Projet Résistance, Programme coton, Cirad-ca, Montpellier

## Introduction

L'implication du CIRAD dans la transgénèse a été initiée en 1989 par H. Carsalade, alors Directeur scientifique. Celui-ci avait souhaité que le CIRAD maîtrise cette nouvelle technique, afin d'en mieux apprécier l'intérêt et les possibilités de sa mise en œuvre pour les plantes tropicales. Le cotonnier, avec l'enjeu de la résistance aux insectes, paraissait une plante modèle pour démarrer cet engagement du CIRAD.

Un projet sur cotonnier a alors été proposé pour la transmission de gènes de résistance aux insectes, en collaboration avec le laboratoire de biologie cellulaire de l'INRA à Versailles..

Après 10 ans de travaux, la situation a considérablement évolué :

1. avec l'expérience, le cotonnier apparaît aujourd'hui comme une plante difficile à travailler: faibles rendements en cals transformés et en cals embryogènes, lenteur des étapes de la culture in vitro, instabilité du transgène. Le cotonnier n'est donc pas « une plante modèle »
2. l'enjeu de la résistance aux insectes sur cotonnier était en effet si important que de grandes firmes biotechnologiques multinationales se sont engagées aussi dans cette voie, avec des moyens si considérables que nos efforts en comparaison, paraissent dérisoires. Par ailleurs, la complexité des brevets impliqués rend impossible une valorisation d'éventuels résultats de notre part sans conclure des accords avec ces mêmes firmes.
3. Enfin, l'évolution de la perception du public vis à vis des OGM, à laquelle l'INRA semble extrêmement attentive, amène la recherche publique à bien redéfinir ses programmes de recherche pour que ses objectifs ne prêtent pas à mauvaise interprétation ou que nous soyons prêts à en justifier leur pertinence.

Tous ces éléments nous amènent à nous demander si la production de plantes génétiquement transformées doit continuer ou s'arrêter dans le futur et si le programme coton doit renforcer ou réduire les moyens qu'il consacre à cette activité.

Ce document tente de donner des éléments pour une discussion sur les orientations stratégiques à prendre en matière de transgénèse cotonnière. Il présente un **Historique** (sous forme de tableaux) des dix années de recherche écoulées, un **Bilan** des recherches conduites à ce jour et une discussion sur les **Perspectives** qui appellent un arbitrage final.

## 1. Historique

Dans les pages suivantes, une série de tableaux retrace les principaux résultats obtenus au cours de ces dix premières années de recherche.

Maîtrise des techniques de régénération et de transformation			
	1989	1990	1991
OPTIONS STRATEGIQUES	Maîtriser la transformation génétique au CIRAD: objectif résistance insecte coton, café	Priorité est donnée à la production de plants transformés plutôt qu'à la régénération de variétés CIRAD	
MOYENS AFFECTES	Mission Pannetier USA	ATP 21/90: transformation du caféier et du cotonnier pour la création de variétés résistantes aux insectes Mazier: stagiaire DEA	ATP 21/90 Dumanois, Mazier en thèse.
CONTACTS, Collaborations	INRA: contrat de collaboration pour 3 ans		Thaïlande: dépôt projet CEE (refusé)
Maîtrise de la transformation et de l'embryogénèse	Régénération de plantules Coker à partir de cals. Essais de régénération sur variétés CIRAD.	Abandon de la régénération de variétés CIRAD	Amélioration du taux d'expression des gènes en utilisant la séquence leader du TMV
RESULTATS sur CryIC		Obtention de Coker transformé avec CryC natif	L'expression du transgène s'avère faible (sur tabac)
RESULTATS sur cryIAb et cryIAc		Obtention de Coker transformé avec CryIab natif	L'expression du transgène s'avère faible (sur tabac)
RESULTATS sur IP			Tests d'IP sur larves de divers insectes (chenilles, anthonome)
Recherche de nouveaux gènes			
Projet Fibre			
AILLEURS DANS LE MONDE	MONSANTO possède des plants transformés résistant au Roundup		



Inefficacité des Bt natifs; nécessité de resynthétiser les gènes			
	1992	1993	1994
OPTIONS STRATEGIQUES	La synthèse des gènes apparaît une nécessité. L'introduction de deux gènes à mode d'action différent (Bt +IP) est proposée comme stratégie pour une résistance durable.	Désir développer nos activités par une collaboration avec la Thaïlande à coût partagé.	Renforcement en Biologie moléculaire
MOYENS AFFECTES	ATP 21/90 Thèse: Dumanois, Mazier.	ATP 23/93: "développement de méthodes de transfert de gènes dans les plantes tropicales" Thèse:Dumanois, Mazier Bourse Lavoisier: Vermeulen (Thaïlande) Stage: Montoro	ATP 23/93 Dumanois, Mazier fin de thèse Vermeulen Thaïlande Montoro: stage Recrutement Giband
CONTACTS, Collaborations	Renouvelle ment du contrat INRA pour 3 ans (1er avenant)	début collaboration Thaïlande KU-PGEU	
Maîtrise de la transformation et de l'embryogénèse	Clonage de la séquence leader du TMV en amont de cryIAb et cryIAc et transfert sur tabac	Etude de promoteurs phloèmes spécifiques (Montoro). Tests vecteurs transfo: C58pMP90, C58 pGV2260 et LB4 4004	Thaïlande: régénération SSR60.Versailles: étude suspension de cals en milieu liquide. Essais bouturage. Choix du vecteur pGV2260.
RESULTATS sur CryIC	Analyse expression Bt dans la plante (thèse Mazier).	Synthèse des premières 335 premières paires de baseCryIC (Mazier)	Construction d'un vecteur portant le gène Mazier. Synthèse gène entier (Giband)
RESULTATS sur cryIAb et cryIAc		Bt n'est pas retrouvé dans les Southern coton (déletion du gène?),mais NPTII est là	Construction vecteurs dans E. Coli Transformation de SSR60 avec gènes marqueurs (Gus, NPTII)
RESULTATS sur IP		OC1 efficace sur Anthonome, CII sur Spodoptera (Dumanois) Transformations	Production de 16 transgènes OC1, et 13 CII,
Recherche de nouveaux gènes			
Projet Fibre			
AILLEURS DANS LE MONDE			

Transformation avec IP et avec Bt synthétiques			
	1995	1996	1997
OPTIONS STRATEGIQUES		Pannetier propose le transfert des activités de transformation en Thaïlande	Réticences de l'INRA vis-à-vis des gènes herbicides de Rhône Poulenc.
MOYENS AFFECTES	CDD: Vermeulen (Thaïlande) démission fin ATP 23/93 Stage Boonrumpun (MAE) (protoplastes)	ATP 20/96: recherche et clonage de promoteurs Embauche Chaïr CDD	embauche Chaïr CDI Stage Bojinov (OTAN) (protoplastes)
CONTACTS, Collaborations	Renouvellement contrat INRA (2ème avenant). Contrat coopération de 5 ans avec Thaïlande	Projet NRCT: financement 3 ans (Thaïlande)	Contacts: Rhône Poulenc pour gènes herbicides.
Maîtrise de la transformation et de l'embryogénèse	Versailles: Amélioration de la régénération par remplacement du 24-D par AIA. Etude conditions d'éclairement	Thaïlande: Tests différents ratios hormones;	Thaïlande: utilisation d'acétosyringone
RESULTATS sur CryIC	Transformation du tabac (septembre) et cotonnier (novembre) avec gène Mazier et gène Giband1.	Bioessais sur tabac négatifs avec gène Giband1 (la séquence utilisée pour réaliser la synthèse s'avère être erronée), de 0 à 100% avec gène Mazier.	2ème version CryIC synthétique (Giband2). Transfert dans un vecteur. Tests sur tabac positifs.
RESULTATS sur cryIAb et cryIAC	16 plants transformés CryIAb natif (INRA).	Introductions cryIAb et cryIAC synthétiques. Construction vecteurs pKYLX71 dans C58pMp90 et C58pGV2260 (cryIAC).. Transfo cryIAb (Thaïlande): vérification présence du gène par PCR sur callus	Thaïlande: 6 lignées cryIAb synthétiques contenant le gène (vérif PCR). Bioessais négatifs Protéine non détectable par Western. Transfo cryIAC: la construction marche pas Construction nouveau vecteur pBIN19 pour cryIAC.
RESULTATS sur IP	16 lignées OC1 et 13 CII introduites à Montpellier	Bioessais négatifs sur puceron (Rahbé)	Introduction plants en serre à Mtp
Recherche nouveaux gènes			
Projet Fibre			
AILLEURS DANS LE MONDE		Début de la diffusion de coton transformé aux USA	



Recombinaison du transgène, inefficacité des plants Bt produits.			
	1998	1999	2000 (programme)
OPTIONS STRATEGIQUES	Réticences de l'INRA par rapport à la valorisation de cryIC. Réunion DS (21 aout: validation objectif programme).	Dépôt brevet CryIC synthétique.	Réunion « quels moyens pour la transgénèse »
MOYENS AFFECTES	Chair à Montpellier (Nov 98).ATP20/96 Début Thèse Pagent Stage Gutman(recherche promoteurs phloemes)	Giband à Mtp (Mars98) Thèse Pagent (suite) Stage Puyou, Guisbert Stage Lebouteiller Stage Nut	Thèse Pagent (suite)
CONTACTS, Collaborations	RPA choisit le CSIRO Contacts:Agrevo, INTA. Contrat COODETEC INRA: 3è avenant (1 an)	Contacts Agrevo: projet collaboration (juillet99) INRA: rédaction d'un nouveau contrat	Fin contrat Thaïlande.
Maîtrise de la transformation et de l'embryogénèse	Thaïlande: étude de l'induction de la callogénèse et expression de l'embryogénèse. Essai bombardement. Etude concentration glutamine, effet de la lumière, dilution Agrobacterium	Montpellier: histologie du processus d'embryogénèse en f(régul croiss utilisés)> déf de la balance hormonale et des étapes de blocage. Etude du système RITA Etude de fact du milieu Versailles: transfo sur souches embryogènes	Vecteur propre
RESULTATS sur CryIC.	Réalisation 2 transfo98. 3 lignées Mazier transfo96	12 lignées transfo98 : bioessais négatifs, insert 3 kb. Séquençage. Réalisation 4 transfo99 . (insert 2kb/qq cals)	Nouvelles expériences de transformation à Versailles et Montpellier.
RESULTATS sur cryIAb et cryIAC	11lignées cryIAb. Transfo IAc. Inra: bioessai tabac. Pb mortalité témoin /IAb. 2/3 plts efficaces/IAc.	18 lignées à Mtp (26 au départ:20 cryIAb, 6 IAc) Inserts anormaux, fbles bandes sur 3(dt1Ac). 27 new lignes en Thaïl.	Une expérience de transformation CryIAC à Montpellier.
RESULTATS sur IP	Dépôt dossier CGB Plantes en serres	Essai Lavalette Envoi graines Brésil	Bioessais Brésil en cours
Autres résultats sur recherche de nouveaux gènes	Disponibles à IGEPAM: CryIE (spodo), Cyt A (Pucerons?), IRB Montréal: CryIIA (H. armigera),	Tests de souches scolytes caféier: 3 réponses positives Ecogene: CryIF spodo)	
Projet Fibre	Démarrage (mars 98)		
AILLEURS DANS LE MONDE		50% surfaces US en coton transformé	

## 2. Bilan

### Objectifs actuels:

Tels que définis depuis 1996, nos objectifs sont les suivants::

1. Donner une image de recherche de qualité qui rejaillisse sur le travail des sélectionneurs de terrain.
2. Se mettre en position de traiter de thèmes qui permettent une valorisation scientifique
3. Fournir du matériel pour les sélectionneurs dans le but de créer une nouvelle génération de variétés possédant des gènes de résistance aux insectes.

### Bilan 1999:

Par rapport à ces objectifs:

1. **L'annonce de notre implication dans la transgénèse a bien servi notre image.** Deux contrats (Thaïlande, Coodetec) ont été conclus en provoquant l'intérêt de nos interlocuteurs grâce à notre affichage biotechnologique. De nombreux autres contacts ont été établis mais auxquels nous sursoyons par prudence (INTA, Inde, etc...)
2. **La Production scientifique a été relativement modeste:** 2 thèses, quelques publications, quelques communications à des colloques (en Thaïlande notamment).
3. **Le matériel transgénique utilisable par les sélectionneurs n'est pas encore disponible:** lignées OC1 et CII en cours d'étude, pas de lignées cryIC, cryIAb ou cryIAC ( très faibles expressions relevées dans 2 lignées cryIAb et 1 cryIAC) et relativement peu de lignées ont été produites (moins d'une centaine d'évènements de transformation différents, tous gènes et tous labos mis ensemble).

Les réalisations apparaissent donc modestes. De plus de nombreuses difficultés apparaissent:

- d'ordre technique: problèmes de recombinaison du transgène à ajouter aux problèmes déjà connus liés à la lenteur du processus et son faible rendement.
- d'ordre politique: notre partenaire dans ce programme, l'INRA, est très réticent à une utilisation commerciale d'éventuels plants produits qui seraient efficaces.
- d'ordre commercial: quand bien même nous aurions des lignées efficaces, il serait pour nous très difficile de les valoriser.

Pendant que nous faisons tous ces efforts, de grandes firmes de biotechnologie (MONSANTO, AVENTIS, CALGENE) travaillant avec des moyens sans commune mesure avec les nôtres, sont présents et attaquent les marchés semenciers du Sud avec de nouvelles variétés OGM (Inde, Asie du Sud-est, Afrique du Sud, Amérique du Sud). A moins que les mouvements de consommateurs remettent en question cette tendance, notre leadership dans certaines zones tropicales est en danger, et peut-être à terme notre activité créatrice en sélection variétale ...

Compte tenu de ces nouvelles données, quelles doivent être nos orientations et quels moyens doit-on consacrer à la transgénèse dans le Programme Coton?



### 3. Perspectives

#### 3.1. Quelles questions sont posées et quel type de décision doit être pris ?

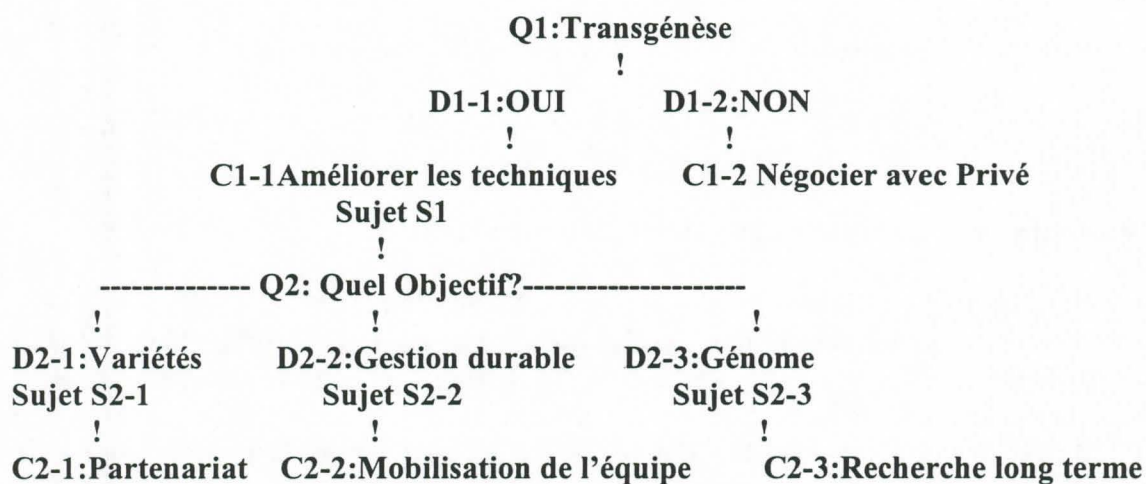
Le Tableau 1 ci-dessous, résume les questions que se pose aujourd'hui le programme Coton.

La Question Q1 : doit-on faire de la transgénèse au programme coton ? conduit à une première décision D1 (Oui/Non)

La réponse Oui à Q1 amène une seconde question Q2 : quel objectif doit-on poursuivre ? Trois décisions peuvent être prises : D2-1 objectif « ressources propres », D2-2 objectif d'étude scientifique des conditions de diffusion des OGM pour éviter une acquisition trop rapide de résistance de la part des insectes D2-3 : utilisation de la transgénèse en application de la Biologie moléculaire pour l'étude du fonctionnement des gènes dans le génome.

Dans les paragraphes suivants nous allons argumenter les réponses qui peuvent être faites à ces deux questions Q1 et Q2.

**Tableau 1 : ARBRE DE DECISION**



#### 3.2. Q1 : Doit-on s'impliquer dans la transgénèse ?

La transgénèse nous apparaît un élément essentiel de l'offre variétale pour les années qui viennent. La concurrence des firmes privées qui possèdent du matériel transgénique va être une donnée importante pour nous. Elle risque de remettre en question notre prééminence sur certains de nos « marchés » traditionnels. Après avoir conquis les USA et l'Australie, les semenciers de coton possédant des OGM, ont des vues sur l'Amérique du Sud, l'Afrique australe et bientôt l'Afrique de l'Ouest.



Doit-on ou non s'impliquer dans la transgénèse, sachant que le coton de demain sera certainement transgénique. Si nous répondons Oui, quels objectifs doit-on poursuivre ? Si nous répondons Non, il faut très vite entamer des discussions pour nous associer avec des firmes multinationales qui transformeront nos variétés (en fait les deux décisions ne sont pas exclusives : on peut faire de la transgénèse mais ne pas suivre les objectifs des multinationales et donc poursuivre nos propres travaux tout en ayant besoin de collaborer).

Nous recommandons, pour des raisons d'image (recherche de qualité, capacité de maîtrise de biotechnologies transférables, etc...) de répondre affirmativement à Q1.

Une réponse affirmative à la question de notre implication en transgénèse, débouche automatiquement sur le Sujet détaillé ci-après, qui en est un corollaire incontournable.

#### **Sujet S1 :**

- étudier la co-transformation pour éliminer les gènes de sélection
- utiliser des promoteurs tissus spécifiques
- améliorer l'embryogénèse pour parvenir à être plus rapide avec de meilleurs rendements
- transformer directement des cals embryogènes pour réduire le délai entre la transformation et l'obtention de plants
- s'affranchir du passage par Coker: transformation méristème, infiltration par tube pollinique.

### **3.3. Avantages et inconvénients des trois objectifs de recherche proposés**

Nous en arrivons à la seconde question Q2: Quels objectifs doit on se fixer?

A cette question, 3 réponses différentes peuvent être faites qui entraînent la définition de trois sujets différents :

#### **S2-1. Produire des plants pour une valorisation immédiate:**

Cet objectif n'est plus « affiché » par le programme (quoiqu'en fait il est clairement exprimé par certains de nos partenaires comme Coodetec) Il suppose que l'on recherchera à diffuser un plant transgénique dès son obtention, même s'il ne porte qu'un seul gène utile. C'est un objectif à court terme (moins de 5 ans). Cet objectif est rejeté par l'INRA parce qu'il ne permettrait pas une « gestion durable » des OGM. Par ailleurs, le problème de la valorisation commerciale des transgéniques correspond à une compétence spéciale qu'il nous est difficile d'acquérir tout seul: valoriser une lignée transgénique suppose le montage de dossiers de toxicologie et la négociation de brevets divers et nombreux (une trentaine). De telles contraintes nous amèneraient à rechercher des partenaires pour aller au bout de ces négociations.

*Doit-on se diriger vers une création rapide de variétés transgéniques CIRAD ?*

*Arguments CONTRE : compte tenu des nécessaires alliances pour commercialiser nos OGM éventuels, des associations du CIRAD avec des firmes multinationales pour exploiter des OGM risquent d'être mal perçues par le public.*

*Arguments POUR : réponse à une demande des agriculteurs du Sud. Possibilité de ressources propres.*



## S2-2: Gestion raisonnée des OGM:

C'est l'objectif que nous affichons aujourd'hui. Il s'agit de ne pas disséminer une variété avec un seul gène mais une variété contenant des constructions plus complexes pour une protection durable. La transformation, du point de vue du CIRAD, doit viser à obtenir l'expression de facteurs agissant dans la plante moins par leur toxicité aigüe, avec pour résultat la mort de l'insecte, que par une action chronique qui réduirait le potentiel biotique des populations. Ainsi déprimées, les espèces nuisibles seraient plus exposées aux facteurs naturels de contrôle et le seuil de nuisibilité de ceux-ci s'en trouverait rehaussé. L'une des voies retenue pour une gestion durables des OGM serait la mise en place de mosaïques de parcelles (OGM/non OGM) et la dissémination de plantes transformées Bt+IP, qui si elles n'entraînent pas la mort de l'insecte, prolongent sa durée de vie larvaire et réduit sa fertilité. Les gènes que nous travaillerons sont ceux qui ne sont pas utilisés par les grandes firmes privées: cryIC, CII, OC1. La poursuite du travail dans cette voie implique l'identification de nouveaux gènes ou la recherche de nouveaux promoteurs.

*Pour ou contre l'implication du CIRAD dans la création de variétés résistantes aux insectes dans le cadre d'une gestion durable des OGM?*

*Arguments CONTRE: Il s'agit d'une activité prenante qui occupera toute l'équipe, et qui n'offre pas aux chercheurs de possibilités de valorisation motivante.*

*Arguments POUR: cette voie de recherche est bien en phase avec la réalité du terrain et des perspectives de valorisation (retour vers le sujet précédent S2-1) peuvent se présenter à terme, lorsque les brevets actuels commenceront à tomber (certains d'entre eux ont plus de 10 ans). Si nous abandonnons la création de lignées transformées, c'est toute notre création variétale qui est menacée de devenir obsolète face à la concurrence des grandes firmes privées. D'autre part, l'exploitation des souchiers Bt (avec Aventis), nous permettra peut-être de trouver de nouveaux gènes d'intérêt (contre coléoptères, piqueurs-suceurs, etc...).*

## S2-3. Transgénèse pour la compréhension du fonctionnement du génome.

Cette activité est complémentaire de l'activité "Génome fibre", elle-même liée à notre effort en cartographie. La transformation est alors un outil pour développer l'analyse de l'expression du génome (validation du statut d'un gène candidat) ou pour développer des lignes améliorées pour la sélection (introduction d'un gène qui améliore les qualités de la fibre). Les objectifs appliqués sont lointains et hypothétiques, avec un terme de 10 ans au minimum.

Dans l'immédiat, l'activité « Génome fibre » projette de constituer une banque des ARN produits par la plante au moment du développement de la fibre ou de retrouver dans le cotonnier des gènes équivalents à ceux d'*Arabidopsis* (orthologues) et impliqués dans des phénomènes d'élongation cellulaire. La transgénèse interviendrait comme outil pour confirmer l'intérêt d'un gène identifié (on transforme la plante pour vérifier l'action sur la plante d'un gène d'intérêt pressenti).

*La transgénèse doit-elle abandonner l'objectif de la résistance aux insectes pour se mettre au service de l'activité Génome Fibre ?*



*Arguments CONTRE: il s'agit d'une recherche qui ne répond pas à une demande explicite du développement. La valorisation commerciale est hypothétique et à très long terme (plus de 10 ans).*

Arguments POUR: la valorisation scientifique y sera possible et le développement de collaborations plus facile. Ce programme peut profiter d'un élan local ou régional (Génoplate, Génopôle, UMR) ou de financements spécifiques (UE, etc...). Le programme coton peut être considéré comme n'étant pas trop en retard par rapport à d'autres équipes et il est possible de bénéficier des avancées réalisées par d'autres chercheurs, du fait d'une espérance de valorisation plus indirecte et donc des contraintes de propriété intellectuelle moindres. C'est cette voie qui est privilégiée par les chercheurs en biotechnologie.

## Conclusion

**Dans l'immédiat, nous gardons le thème de la résistance aux insectes, avec l'objectif de finir le programme CryIC en isolant un plant efficace.** On peut se fixer la fin de l'année 2000 ou la production d'une centaine de plants CryIC (issue d'événements de transformation différents) comme échéance à ce programme. La production de plants CryIAb et CryIAC (Programme Thaïlande) est progressivement abandonnée.

A l'issue de cette étape, il faudra se prononcer sur la suite de notre implication dans la gestion raisonnée des OGM.

- soit nous continuons dans la voie de la résistance aux insectes **et toute l'équipe actuelle continue à être mobilisée sur ce thème**, et doit même être renforcée d'un technicien, pour assister les chercheurs dans le domaine de la production de plants transformés.
- soit nous l'abandonnons et les travaux de l'équipe se réorienteront vers des domaines plus prospectifs comme l'utilisation de la transgénèse pour étudier le fonctionnement du génome et l'activité de l'équipe de transformation rejoint celle des biologistes moléculaires..